AUS DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄTS-POLIKLINIK BASEL
(DIREKTOR PROFESSOR DR. A. GIGON)

Biochemische Bedeutung der Sulfo - Phospho - Vanillin - Reaktion (S.P.V.R.) im Blutserum

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität
Basel

Vorgelegt von

Alois Schnoz

aus Somvix, Kt. Graub.

BASEL, 1941

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt
auf Antrag von Herrn Professor Dr. med. A. Gigon

Promotionstag 5. Juni 1941

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546711_0107

Biochemische Bedeutung der Sulfo-Phospho-Vanillin-Reaktion (S.P.V.R.) im Blutserum

Die Sulfo-Phospho-Vanillin-Reaktion (S.P.V.R.) wurde zuerst durch Inouye[1]) als Sulfo-Vanillin-Reaktion angewendet, und zwar zum Nachweis der Gallensäuren im Blutserum. Inouye führte seine Reaktion aus wie folgt:

2 cm³ einer Gallensäure enthaltenden Flüssigkeit versetzt man mit 0,03 gr Vanillin und unterschichtet mit konzentrierter Schwefelsäure. Es entsteht ein roter Ring und beim Mischen eine rote Lösung, die bald braun, dann gelb und später violett wird.

Die Inouye'sche Sulfo-Vanillin-Reaktion wurde von den Franzosen Chabrol und Charonnat[2]) [3]) abgeändert und von diesen dann Sulfo-Phospho-Vanillin-Reaktion (S.P.V.R.) benannt. Die Reaktion wurde folgendermaßen modifiziert:

Man fügt zu 0,1 cm³ Serum 4,9 cm³ konzentrierte Schwefelsäure hinzu und erhitzt diese Mischung in einem Reagenzglas während 10 Minuten im siedenden Wasserbad. Hernach kühlt man die Lösung unter dem Leitungswasser ab. 0,4 cm³ dieser Flüssigkeit werden nun mit 3,6 cm³ Phosphorsäure (d=1,7) und 1 cm³ einer wässerigen 0,6 prozentigen Lösung von Vanillin durchsetzt. Es entwickelt sich eine rote Färbung von mehr oder weniger starker Intensität, die man nach 10 Minuten mittels eines Colorimeters mißt.

Die auf diese Weise modifizierte Reaktion weicht von der ursprünglichen Inouye'schen Reaktion insofern ab, daß das Zustandekommen der Reaktion nicht durch die Gallensäuren bedingt ist, sondern durch andere Substanzen, und die Diskussion über die biologische Bedeutung steht nach den Autoren [4]) noch offen.

Wir haben die S.P.V.R. nach der angegebenen Technik mittels des Stufen-Photometers einem eingehenden Studium unterzogen. Die gefundenen Werte haben wir in % Cholesterol ausgedrückt und haben nach einem Zusammenhang gesucht zwischen dieser Reaktion und den im Serum enthaltenen Substanzen, welche in einer Sulfo-Phosphorsäure-Lösung mit Vanillin eine rötliche Farbe zu erzeugen imstande sind.

Stabilität der Reaktion und Wahl des Photometer-Filters

Bevor wir die Eichkurve des Apparates bestimmen, müssen wir die Reaktion selbst studieren, nämlich 1.) ihre Stabilität, und 2.) den Einfluß gewisser physikalischer Faktoren, welche die Endreaktion beschleunigen oder verlangsamen könnten.

Die Wahl des Farbfilters, der die stärkste Lichtabsorption ergibt,

bot keinerlei Schwierigkeiten. Wir sind dazu von einer 0,1 bis 0,2prozentigen Cholesterol-Lösung in Chloroform ausgegangen. 1 cm³ dieser Lösung wird bis zur Trockne eingedampft. Man fügt 5 cm³ konzentrierter Schwefelsäure hinzu und läßt die Flüssigkeit während 10 Minuten im siedenden Wasserbad. Nach Abkühlung unter dem Wasserhahn, entnimmt man davon 0,4 cm³ und setzt 3,6 cm³ Phosphorsäure (d=1,7) zu. Mittels eines Glasstäbchens, dessen unteres Ende schaufelförmig abgeplattet ist, wird die Lösung gut durcheinandergerührt. Darauf fügt man 1 cm³ einer 0,6prozentigen Vanillin-Lösung hinzu, rührt wiederum sorgfältig auf, und nach 15 Minuten vollzieht man die Ablesung im Photometer in der 1 cm³-Küvette. Wir haben dabei folgende Werte erhalten:

Filter:	S 43	S 47	S 50	S 53	S 57	S 61	S 72	S 75
% des durchgelassenen Lichts:	34	37	21	11,5	33	70,5	88	88

Unser Filter der Wahl ist also das grüne Filter S 53, da dieses die stärkste Lichtabsorption ergibt, wie wir das aus den oben angeführten Zahlen ersehen können.

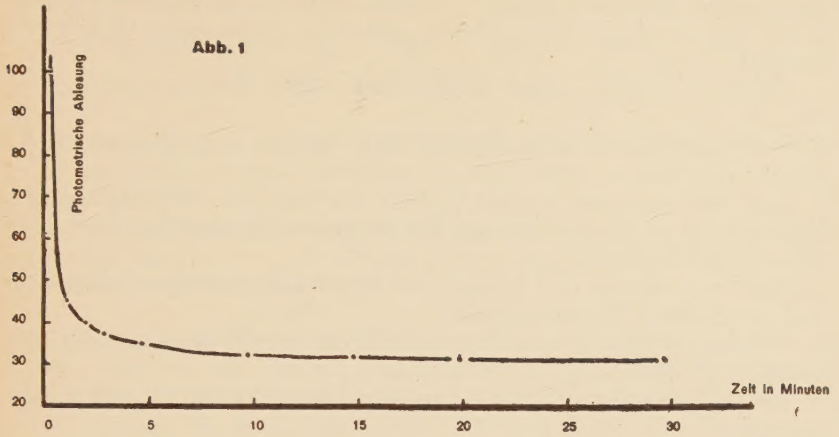
Wir haben darauf untersucht, nach wie langer Zeit die Färbung stabil bleibt. Als Probeserum diente uns das Blutserum von Frau B. (Pneumonie, Subicterus). Wir haben mit 0,1 cm³ dieses Serums die Reaktion, wie Chabrol, Charonnat und Blanchard [4]) sie angeben, ausgeführt, aber mit dem Unterschied, daß wir anstelle einer wässerigen Vanillin-Lösung eine alkoholische verwendeten. Wie wir später noch sehen werden, bleibt es sich nämlich gleich für das Resultat, ob wir eine wässerige oder eine alkoholische Vanillin-Lösung benutzen.

Die photometrischen Werte wurden nach verschiedenen Zeiten bestimmt, und die erhaltenen Werte, die wir auch mittels einer Kurve zur Darstellung bringen, sind folgende:

Zeit in Minuten	0	1	2¼	3¼	5	10	15	20	30	60	120	270
Ablesung auf dem Photometer	100	45	40	39,5	35	33	32	32	32	31	31	30

Praktisch ist also die R.S.P.V. stabil 15 Minuten nach Hinzufügen des Vanillins. (Die Differenz zwischen der Zeit von 15 und 120 Minuten beträgt bloß 1 photometrische Einheit.) Wir haben daher alle Messungen nach 15 Minuten vorgenommen.

Wie wir aus den folgenden Werten ersehen können, bleibt die Reaktion durch die physikalischen Faktoren Licht und Temperatur unbeeinflußt:



1. Der Einfluß des Lichtes wurde geprüft auf 0,1 cm³ einer 0,5prozentigen Cholesterol-Lösung, und zwar wurde die R.S.P.V. ausgeführt:

a) in der Dunkelheit (¼ Std.): Photometrischer Wert . . 46

b) im Tageslicht: Photometrischer Wert 46

2. Der Einfluß der Temperatur wurde geprüft auf 0,1³ einer 0,5-prozentigen Cholesterol-Lösung, und zwar wurde die R.S.P.V. ausgeführt:

a) im Kühlschrank (4°): Photometrischer Wert 46

b) im Thermostat (38°): Photometrischer Wert . . . 45

Von großer Bedeutung für die S.P.V.R. ist die Reihenfolge des Einführens der Reagenzien. Diese müssen immer in der oben angegebenen Reihenfolge hinzugefügt werden, und es ist auch darauf zu achten, daß sie jedesmal mittels des Glasstäbchens sorgfältig durchmischt werden. Ein Beispiel beleuchtet die Tatsache, daß eine peinlich genaue Technik wichtig ist:

A) Bei einer Serie von 6 Reagenzgläsern, in die wir 0,4 cm³ der Schwefelsäurelösung, darauf 3,6 cm³ Phosphorsäure (d=1,7), und nach sorgfältiger Durchmischung 1 cm³ Vanillin-Lösung einführten, zeigten die Ablesungen am Photometer nach 15 Minuten folgende Werte:

53,3 52 52,5 53,5 52 53

B) In eine zweite Serie von 6 Reagenzgläsern führten wir zuerst wie gewöhnlich 0,4 cm³ der Schwefelsäurelösung ein, darauf aber, anstatt Phosphorsäure und Vanillin einzeln hinzuzufügen, vermengten wir diese beiden Flüssigkeiten just vor dem Gebrauch (die verwendeten Mengen bleiben exakt gleich), und gossen nun die frisch berei-

tete Lösung zu. Durch dieses Vorgehen erfuhren die photometrischen Werte eine merkliche Abweichung, und zwar (auch nach 15 Minuten bestimmt):

39 34 34,5 33,5 33 34

Der Durchschnittswert beträgt 34,6 und ist von dem unter A) völlig verschieden.

Nun erst, nachdem wir die Technik der Reaktion festgelegt hatten, konnten wir an die Darstellung der Eichkurve herangehen. Das Vorgehen war folgendes:

Wir verwendeten eine Lösung von 0,5 % Cholesterol in Chloroform und benutzten 4 Reagenzgläschen:

Ins Reagenzglas Nr. 1 gossen wir 0,4 cm³ der Lösung, was 0,1 cm³ à 2 % entspricht,

ins Reagenzglas Nr. 2: 0,2 cm³ der Lösung, was 0,1 cm³ à 1 % entspricht,

ins Reagenzglas Nr. 3: 0,1 cm³ der Lösung,

und das Reagenzglas Nr. 4 ließen wir leer.

Nach Verdampfen des Chloroforms führten wir in allen 4 Reagenzgläsern die S.P.V.R. durch, indem wir uns strikte an die oben festgelegten Anweisungen hielten. Die Werte, die wir 15 Minuten nach Hinzufügen des Vanillins erhalten haben, geben wir hier wieder und stellen sie auch graphisch dar:

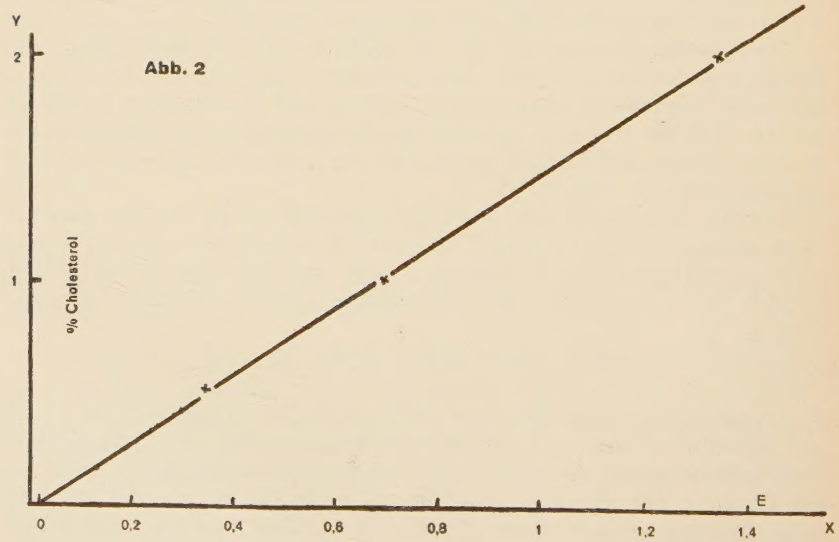


Abb. 2

Cholesterol in %:	2 %	1 %	0,5 %	0
Photometrische Werte:	4,6	19,9	46	95
Extinktions-Koeffizient:	1,337	0,701	0,342	0,022

Die Abbildung 2 zeigt die graphische Darstellung des Cholesterols in % als Funktion des Extinktions-Koeffizienten.

Aus dieser graphischen Darstellung ersehen wir, daß die Konzentration der Cholesterol-Lösung proportionell ist zum Extinktions-Koeffizienten (Beer'sches Gesetz).

So ist es nicht schwer, die Gleichung dieser Geraden zu berechnen. Zu beachten ist, daß sie am Ursprungspunkt eine Ordinate aufweist, was daher rührt, daß die Reaktion, wenn sie mit den Reagenzien allein ausgeführt wird, also ohne Vorhandensein von Cholesterol, eine leichte Gelbfärbung erzeugt, die etwas Licht absorbiert. Wir haben daher diese Ordinate am Ursprungspunkt zu bestimmen und den Winkelkoeffizienten der Geraden, also 2 unbekannte Größen. Dazu wählen wir 2 verschiedene Konzentrationen und die beiden entsprechenden Extinktions-Koeffizienten und erhalten auf diese Weise 2 Gleichungen, wodurch die Bedingungen zur Berechnung der beiden unbekannten Größen gegeben sind und wir folgende Formel aufstellen können:

$$\% \text{ Cholesterol} = 1{,}5 \times E - 0{,}03.$$

Diese Gleichung läßt die S.P.V.R. als Funktion der photometrischen Extinktion in % Cholesterol ausdrücken.

Anmerkung:

Wir haben weiter oben bereits ausgeführt, daß wir anstelle einer wässerigen, eine alkoholische Vanillin-Lösung verwendeten; denn die Löslichkeit des Vanillins im Alkohol ist größer als im Wasser. Eine wässerige Lösung muß man erwärmen, um die gewünschte Konzentration von 0,6 % zu erhalten. Beim Herstellen der alkoholischen Lösung erübrigt sich diese Maßnahme. Auch schien es uns, daß sich die alkoholische Lösung besser konserviere als die wässerige, obwohl man auch die alkoholische Lösung nicht zu alt werden lassen darf, denn zu lange konservierte Vanillin-Lösungen verfärben sich gelblich und ergeben dann zu niedrige Werte. Deshalb bereiteten wir alle 8 Tage eine frische Lösung von Vanillin.

Was die Resultate angeht, die man mittels einer wässerigen und einer alkoholischen Lösung erhält, so bleiben sich diese identisch. Der Leerversuch

ergibt einzig eine etwas blassere Färbung mit der wässerigen Lösung, und dann ist die Formel, welche die S. P. V. R. als Funktion von E berechnen läßt, etwas verschieden. Wir erhalten nämlich: % Cholesterol = 1,8 × E — 0,01.

Die nachfolgenden Werte zeigen, daß wir ebensogut eine wässerige wie eine alkoholische Lösung zur Ausführung der S. P. V. R. verwenden können:

	Alkohol. Lösung: S. P. V. R. in % Cholesterol	**Wässerige Lösung:** S. P. V. R. in % Cholesterol
Triolein-Lösung 0,8 %	0,82	0,82
H. ♂ (Icterus catarrhalis)	0,46	0,46
B. ♂ (Myocardschäden)	0,96	1,03
D. ♀ (Wirbelsäulenaffektion)	0,71	0,71
Normales Kaninchen No. 1	0,16	0,16
Normales Kaninchen No. 2	0,31	0,31

Die Differenzen bleiben innerhalb der Fehlergrenze. Eine Ablesungsdifferenz von 2 photometrischen Einheiten ist mit dem Filter S 53 sehr wohl möglich, was dann für einen Wert der S. P. V. R. von 0,71 einen Wert von 0,78 ergibt, wenn man 2 photometrische Einheiten zu wenig abliest, also eine Differenz von 0,07.

Beziehungen zwischen dem Cholesterolgehalt des Blutserums und der S.P.V.R.

Die französischen Autoren Chabrol, Charonnat und Blanchard glaubten zuerst, daß es sich um eine lineare Beziehung handle zwischen dem Cholesterolgehalt und der S.P.V.R. Nachdem sie eine Anzahl von Cholesterolbestimmungen durchgeführt hatten und zugleich die S.P.V.R. in verschiedenen Sera, kamen sie zur Ueberzeugung, daß ihre Annahme nicht stimmte. Wir haben diese selbe Idee wieder aufgenommen und haben in zirka 30 Experimenten die Cholesterolbestimmung nach der Liebermann'schen Methode vorgenommen. Dabei sind wir wie folgt vorgegangen:

Enteiweißung in einem Erlenmeyer-Kolben von 0,25 cm³ Serum durch 5—6 cm³ Alkohol-Aether (3 Teile Alkohol, 1 Teil Aether). Nach kurzem Aufkochen läßt man das Ganze abkühlen und filtriert die Flüssigkeit dann in eine Porzellanschale von 7—8 cm Durchmesser. Der Erlenmeyer-Kolben und das Filter werden mehrmals mit etwas Alkohol-Aether gespült. Der Inhalt der Schale wird bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand durch mehrmaliges Hinzufügen von kleinen Mengen Chloroform aufgelöst und durch einen Wattebausch filtriert. Das Filtrat wird in einem 10 cm³ Zylindergefäß (das gra-

duiert und mit einem Glaspfropf versehen ist), gesammelt. Man spült bis zum Volumen von 5 cm³. Daraufhin fügt man genau 2 cm³ einer Mischung von 2 cm³ Essigsäure-Anhydrid und 0,1 cm³ konzentrierter Schwefelsäure hinzu. Nach sorgfältiger Durchmengung wird die Flüssigkeit 5 Minuten in die Dunkelheit gestellt, worauf man die Ablesung am Photometer beginnt und die Entwicklung der Grünfärbung verfolgt, bis man den besten photometrischen Wert erhält [5]). Man benutzt dazu die 1 cm³-Küvette und das rote Filter S 61. Indem wir den Extinktions-Koeffizienten mit E ausdrücken, können wir die Formel aufstellen:

$$\text{mg \% Cholesterol} = \frac{180 \times E}{0{,}398}$$

Eine Standardlösung von 45 mg % Cholesterol (1 cm³) ergibt einen Extinktions-Koeffizienten von 0,398. Die Cholesterolmenge in 0,25 cm³ Serum,

die $E = \frac{0{,}45 \times E}{0{,}398}$ ergibt, also in % $\frac{0{,}45 \times E \times 4 \times 100}{0{,}398}$ ist: $\frac{180 \times E.}{0{,}398}$

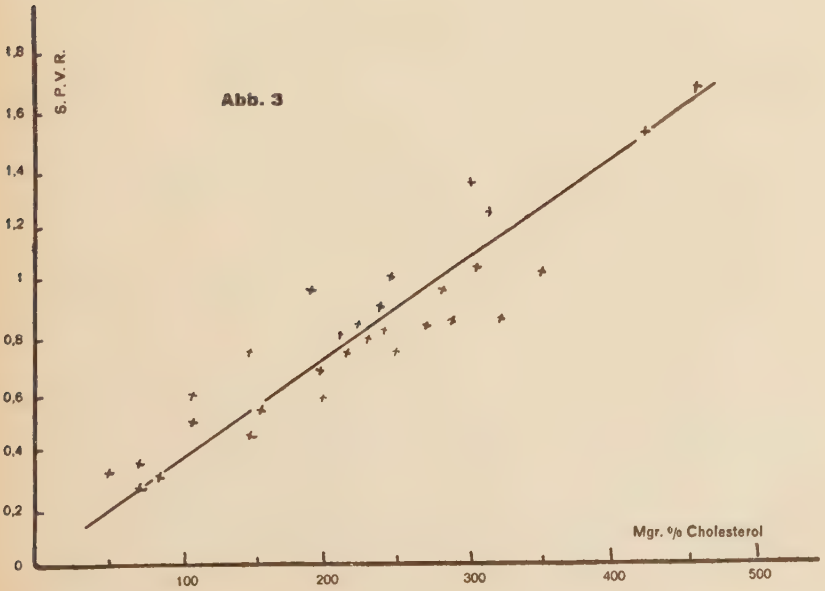


Abb. 3

Diese Figur zeigt, daß kein absoluter Parallelismus besteht zwischen der S.P.V.R. und dem Cholesterolgehalt; denn das Cholesterol ist nicht die einzige Substanz im Organismus, welche die S.P.V.R. erzeugt.

Chabrol, Charonnat und Blanchard behaupteten, die stärksten Icterusfälle würden die deutlichsten S.P.V.R. ergeben. Das Problem, ob eine Beziehung bestehe zwischen dem Bilirubingehalt und der S.P.V.R. fällt dahin, da das Bilirubin in vitro die Reaktion nicht bildet. Beachtenswert erscheint uns, daß die genannten französischen Autoren von einem Bilirubingehalt von 1—1,5 gr pro Liter, also 100—150 mgr %, sprechen. Diese Werte sind unserer Ansicht nach übertrieben hoch. Die stärksten Icterusfälle, die wir in unserm Laboratorium kontrollierten, haben nie den Wert von 30 mgr % überschritten, und zwar haben wir die Bestimmung dieses Pigments nach der wahrscheinlich besten Methode vorgenommen, nämlich der von Jendrassik[6]). Es ist bedauerlich, daß die französischen Autoren ihre Analysen-Methoden nicht angeben, sonst hätten wir ihre Technik zur Kontrolle unserer Resultate anwenden können.

Da es Chabrol, Charbonnat und Blanchard nicht klar zu sein schien, wieso die S.P.V.R. am stärksten bei erhöhtem Cholesterolgehalt ausfalle, haben sie nach einer eventuellen Beziehung zu andern Stoffen gesucht. Der Fehler, den sie begingen, war der, daß sie jede einzelne der aktiven Substanzen in Erwägung zogen, nicht aber alle Substanzen in ihrer Gesamtheit. Wenn man nämlich darauf ausgeht, den Anteil einer jeden Substanz am Zustandekommen der S.P.V.R. zu ergründen, so findet man, daß die Summe dieser partiellen Reaktionen gleich ist der eigentlichen S.P.V.R. im Serum.

Es stellt sich nun die Frage: Um was für Faktoren handelt es sich, und in welcher Proportion spielen sie eine Rolle?

Die Differenz zwischen der S.P.V.R. in % Cholesterol berechnet und dem Cholesterolgehalt in einem Normalserum ist sehr erheblich. Wir fanden nämlich folgende Werte:

S.P.V.R. = 0,71 = 710 (in mgr % Cholesterol ausgedrückt).
Cholesterolgehalt: 196
Differenz 514

Diese Zahlen zeigen, daß das Cholesterol nur zu einem kleinen Teil an der Entstehung der Reaktion schuld ist. Die übrigen Substanzen, die bei dieser Reaktion mitspielen, sind vor allem: die ungesättigten Fettsäuren, das Lezithin und gewisse Gallensäuren, worunter die Desoxycholsäure. Die Cholalsäure hingegen bildet die Reaktion nicht, was uns der nachfolgende Versuch bewies:

0,1 cm³ Cholalsäure à 800 mgr % : S.P.V.R. = 0.

Obwohl die Desoxycholsäure an der Erzeugung der S.P.V.R. teil hat, kann deren Rolle dennoch vollkommen unbeachtet gelassen werden. Denn der Gehalt des Serums an Gallensäuren ist nie sehr hoch, und unter diesen findet sich nur ein kleiner Teil als Desoxycholsäure. Nehmen wir den Fall eines starken Retentions-Icterus bei F.♂ : Bilirubin : 15,1 mgr %, Gallensäuren : 11,8 mgr % (Normalwert = kleiner als 1). Von der Hypothese ausgehend, daß die Zusammensetzung der Gallensäuren im Serum eines Icterus-Kranken, dessen Icterus hepatischen Ursprungs ist, dieselbe sei wie die in der Galle (Desoxycholsäure : Cholalsäure = 1 : 3), findet man, daß auf 11,8 mgr % Gallensäuren ungefähr 3 mgr % Desoxycholsäure entfallen. Eine Lösung von reiner Desoxycholsäure à 800 mgr % *), die wie das Serum behandelt wurde, erzeugte eine S.P.V.R. von 0,44. In einem Serum mit einem Gehalt von 11,8 mgr % Gallensäuren ergibt die Desoxycholsäure eine S.P.V.R. von 0,44 x 3 = 0,0016, also einen Wert, den man vollständig vernachlässigen kann. Die Bestimmung der Gallensäuren wurde nach einer Methode, die im Laboratorium der hiesigen Universitätspoliklinik ausgearbeitet wurde, vorgenommen [7]).

Rolle der Lipoide

Chabrol, Charonnat und Blanchard [4]) haben nach einem Zusammenhang gesucht zwischen der S.P.V.R. und dem Gehalt der Fettsäuren. Wenn diese Autoren zuerst der Ansicht waren, es müsse sich eine gewisse lineare Beziehung zwischen dem Gesamtgehalt der Lipoide und der S.P.V.R. finden lassen und hofften, in dieser Reaktion eine einfache und rasch ausführbare Technik zur Bestimmung der Lipoide im Blut entdeckt zu haben, so mußten sie diese Erwartung aufgeben, da die Experimentation die erhofften Resultate nicht brachte. Im Grunde zeigt ein einigermaßen näheres Eingehen auf die Frage, daß man die Annahme, es bestehe eine Proportionalität zwischen den Lipoiden und der S.P.V.R., fallen lassen muß. Unsere Untersuchungen haben den Beweis erbracht, daß nicht alle Lipoide die S.P.V.R. erzeugen. Unter den Fettsäuren bilden nur die mit einer oder mehreren Doppelbindungen die Reaktion. Es ist daher eher angebracht, nicht den Gesamtgehalt der Lipoide zu bestimmen, sondern vielmehr die Jodzahl, und die Beziehung zu ergründen zwischen dieser und der S.P.V.R.

---

*) Von der Firma Hoffmann-La Roche in zuvorkommender Weise zu unserer Verfügung gestellt.

Der nachfolgende Versuch beweist deutlich, daß einzig die ungesättigten Fettsäuren unter den Lipoiden imstande sind, die S.P.V.R. zu erzeugen:

	S.P.V.R. in % Cholesterol:
0,1 cm³ Tripalmitinlösung à 800 mgr % =	0
0,1 cm³ Tristearinlösung à 800 mgr % =	0
0,1 cm³ Trioleinlösung à 800 mgr % =	0,82

Um den Anteil der ungesättigten Fettsäuren im Serum zu bestimmen, sind wir von einer Lösung von 80 mgr % Triolein in Chloroform ausgegangen.

1 cm³ dieser Lösung (entspricht 0,1 cm³ à 800 mgr %) wird im Wasserbad eingedampft, und mit dem Rückstand wird darauf die Reaktion ausgeführt.

Daneben haben wir mit derselben Menge Triolein die Jodzahl bestimmt und haben diese ausgedrückt in Natriumthiosulfat N/200. Wir erhielten dabei folgende Resultate:

S.P.V.R.: 0,1 cm³ Triolein à 800 mgr % = 0,82 S.P.V.R.
Jodzahl: 0,1 cm³ Triolein à 800 mgr % = 0,91 cm³ $Na_2S_2O_3$ N/200

Also 1 cm³ $Na_2S_2N_3$ N/200 entspricht 0,90 S.P.V.R.

Dieses Verhältnis gestattet uns, den entsprechenden Wert der S.P.V.R. zu berechnen, da wir die Jodzahl eines Serums in Natriumthiosulfat N/200 ausgedrückt, kennen.

Die Bestimmung der Jodzahl haben wir nach Angaben von Thomas in seinem Handbuch der Biochemie [7]) durchgeführt. Wir können diese Methode, die für die Anwendung beim Serum etwas modifiziert wird, folgenderweise zusammenfassen:

Man beginnt mit der Enteiweißung von 1 cm³ Serum, wie wir das schon weiter oben für die Bestimmung des Cholesterols beschrieben. Dann filtriert man in einen graduierten 25 cm³-Zylinderkolben und wäscht den Niederschlag, bis das Volumen von 20 cm³ erreicht ist. Man durchmischt die Flüssigkeit sorgfältig, indem man das Zylindergefäß ein bis zweimal kippt. Darauf entnimmt man zweimal 5 cm³ Flüssigkeit (entsprechend 0,25 cm³ Serum), die man in zwei Erlenmeyerkolben (von 50 bis 100 cm³ Inhalt, mit verdickten Glaswänden und einem Glaspfropf versehen) hineinbringt. Diese Erlenmeyerkolben sind vorher mit Schwefel-Chromsäuregemisch gereinigt worden. Parallel dazu macht man einen Leerversuch mit 5 cm³ des Alkohol-Äthergemisches, das wir zur Enteiweißung verwendeten.

Die Lösungsmittel werden im Vakuum abgedampft. Hierauf fügt man 1 cm³ Tetrachlorkohlenstoff hinzu und hernach genau 2 cm³ einer

Brom-Jod-Lösung N/100 in Essigsäureanhydrid. Während ½ Stunde läßt man das Ganze in der Dunkelheit stehen, und nach Hinzusetzen von 1 cm³ zweiprozentiger Kaliumjodid-Lösung titriert man den Reagenzüberschuß. Die Titrierung kann mittels einer N/100 oder N/200 Lösung von Natriumthiosulfat vorgenommen werden. Da wir zu unserer Verfügung eine N/200 Lösung hatten, haben wir unsere Titrierung mit diesem Reagenz ausgeführt. Die Differenz des beim Leerversuch erhaltenen Wertes ist proportionell der Menge des durch die doppelte, oder die doppelten Bindungen der ungesättigten Fettsäuren gebundenen Jods. Wir haben die gefundenen Werte in cm³ $Na_2S_2O_3$ N/200 pro 0,1 cm³ Serum ausgedrückt.

Beispiel: Serum W ♂ (Darmkatarrh):

Blindwert	= 3,90	$Na_2S_2O_3$ N/200
Serum	= 2,52	$Na_2S_2O_3$ N/200
Differenz	= 1,38	$Na_2S_2O_3$ N/200

Also: cm³ $Na_2S_2O_3$ N/200 pro 0,1 cm³ Serum $= \frac{1,38}{0,25} = 0,55$.

Dieser Wert von 0,55 cm³ $Na_2S_2O_3$ N/200 entspricht dem Wert von $0,55 \times 0,90 = 0,49$ S.P.V.R. (unter Berücksichtigung der Beziehung der Jodzahl zur S.P.V.R.). Wir ersehen daraus, daß die Rolle der ungesättigten Fettsäuren von Wichtigkeit ist.

Ein weiterer Faktor, der bei der S.P.V.R. mitspielt, ist das Lezithin, dessen Gehalt im normalen Blutserum 130—160 mgr % beträgt. Wir haben die S.P.V.R. mit einer Lösung von reinem Lezithin à 800 mgr % (Lezithin ex ovo) ausgeführt und folgende Werte erhalten, die wir wie früher in % Cholesterol ausdrücken:

0,1 cm³ Lezithin-Lösung à 800 mgr % ergibt eine S.P.V.R. von 0,48, also ergibt 0,1 cm³ Lezithin-Lösung à 100 mgr % eine S.P.V.R.

von $\frac{0,48}{8} = 0,06$.

Um die Rolle des Lezithinfaktors zu ermessen, genügt es, den Gehalt der Phospholipoide des Serums zu bestimmen, und jede 100 mgr % mit 0,06 zu multiplizieren. Die Lezithinbestimmung wurde nach der Manceau-Gigaut'schen Methode durchgeführt [8]): das Filtrat, das man durch Alkohol-Äther-Enteiweißung des Serums erhält, wird bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird durch eine Mischung von Schwefel- und Salpetersäure oxydiert, und aller Phosphor wird als Orthophosphat filtriert, um nachher colorimetrisch bestimmt zu werden nach der Methode von Denigès (Molybdänsäure-Zinnchlorür) [9]).

Beispiel: Serum W. ♂ (Darmkatarrh):

Lezithin-Gehalt : 135 mgr %

Entsprechende S.P.V.R. : $\frac{135 \times 0{,}06}{100} = 0{,}08$

Dieses Beispiel zeigt uns, daß der Anteil des Lezithins an der S.P.V.R. um etwas kleiner ist, als der des Cholesterols.

Zusammenfassend können wir sagen, daß die drei Faktoren — und es sind deren ja nur diese drei, die einen merklichen Einfluß auf die S.P.V.R. ausüben, wie sich aus unserer Abhandlung ergibt — ihrer Wichtigkeit nach sind:

1. die ungesättigten Fettsäuren,
2. das Cholesterol, und
3. das Lezithin.

Normalwerte der S.P.V.R.

Da wir den Normalgehalt der ungesättigten Fettsäuren, des Cholesterols und des Lezithins kennen, ist es leicht, die Berechnung des Normalwertes der S.P.V.R. anzustellen.

Normalgehalt:		In S.P.V.R. berechnet:
Ungesättigte Fettsäuren	350—450 mgr %	0,36—0,45
Cholesterol	160—230 mgr %	0,16—0,23
Lezithin	130—160 mgr %	0,07—0,09
Der Normalwert der S.P.V.R. beträgt also:		0,59—0,78
Aufgerundet: zwischen 0,6—0,8		

Jeder Wert unter 0,6 zeigt also an, daß wenigstens eine der drei Substanzen, welche die S.P.V.R. ergeben, im Blutserum in zu geringer Menge vorhanden ist, und jeder Wert über 0,8 bedeutet das Vorkommen in zu großer Menge irgendeines der drei genannten Faktoren.

Wenn auch die S.P.V.R. einen Normalwert aufweist, so heißt das absolut nicht etwa, daß deswegen der Gehalt der ungesättigten Fettsäuren, des Cholesterols und des Lezithins, auch den Normalwert aufweist, denn das Manko oder das Plus einer dieser Substanzen kann kompensiert werden durch einen niedrigeren oder höheren Gehalt einer der übrigen Substanzen.

Es bleibt uns noch übrig zu zeigen, daß die im Blutserum ausgeführte S.P.V.R. genau dieselben Werte ergibt, wie die, welche man bestimmen kann, indem man den Anteil jedes der drei Faktoren

an der Reaktion berechnet. Wir haben das an einer Serie von zwölf Beispielen berechnet. Die in Klammern stehenden Zahlen bezeichnen den Wert der entsprechenden S.P.V.R.

	Serum	Cholesterol	Jodzahl	Lezithin	S.P.V.R. gefunden	S.P.V.R. berechnet
A. ♂	(Anaemia	138	0,40	160	0,58	
	perniciosa)	(0,13)	(0,36)	(0,09)		0,58
F. ♂	(Lues III)	280	0,62	148	0,96	
		(0,28)	(0,56)	(0,08)		0,92
M. ♀	(Graviditas	224	0,58	203	0,90	
	mens V—VI)	(0,28)	(0,52)	(0,12)		0,86
P. ♂	(Myeloische	177	0,34	146	0,59	
	Leukämie)	(0,17)	(0,31)	(0,09)		0,57
R. ♂	(Tbc. pulm.)	225	0,55	147	0,80	
		(0,22)	(0,49)	(0,09)		0,80
W. ♀	(Lebercirrhose,	138	0,39	128	0,56	
	Aethylismus)	(0,13)	(0,35)	(0,08)		0,56
Z. ♂	(Atriovetrikul.	221	0,50	164	0,81	
	Block)	(0,22)	(0,45)	(0,10)		0,77
M. ♂	(Mononucleosis	185	0,45	132	0,67	
	infectiosa)	(0,18)	(0,41)	(0,08)		0,67
W. ♀	(Icterus, Myode-	170	0,46	113	0,70	
	generatio cordis)	(0,17)	(0,42)	(0,07)		0,68
F. ♀	(Stat. n. essent.	195	0,60	163	0,90	
	Thrombopenie)	(0,19)	(0,54)	(0,10)		0,83
V. ♀	(Hypertonie)	230	0,52	150	0,79	
		(0,23)	(0,47)	(0,09)		0,79
V. ♂	(Darmkatarrh)	287	0,55	135	0,87	
		(0,28)	(0,49)	(0,08)		0.85

Alle Differenzen, die wir zwischen dem experimentell gefundenen und dem berechneten Wert sehen (Maximaldifferenz=0,07) bleiben innerhalb der Fehlergrenze. Wir ersehen aus den oben angeführten Werten, daß die experimentell gefundene S.P.V.R. die Summe ist der einzeln berechneten S.P.V.R. der ungesättigten Fettsäuren, des Cholesterols und des Lezithins.

Welches ist die klinische Bedeutung des S.P.V.R.

Dadurch, daß die S.P.V.R. von verschiedenen Faktoren abhängig ist, hat sie nicht das Privileg, eine spezifische Reaktion zu sein. Folglich hat sie auch keinen großen diagnostischen Wert. Jeder Faktor, der den Gehalt der Lipoide des Blutes beeinflussen kann, hat also auch eine Rückwirkung auf die S.P.V.R. Zu den Lipoiden des Blutes werden neben den eigentlichen Fetten auch das Cholesterol und das Lezithin gerechnet.

Ueber die S.P.V.R. haben wir mehr als 50 Sera-Versuche angestellt, und wir geben hier die gefundenen Werte wieder, indem wir deren Intensität in absteigender Reihenfolge klassieren:

	Serum	Bilirub.	Gallens.	Cholesterol	Jodzahl	Lezithin	S.P.V.R.
G. ♂	(Icterus, Ca. pulm)	26,3	5,5	452	—	—	1,70
S. ♂	(Abgeh. Pleuritis)	2,8	—	403	—	—	1,29
G. ♂	(Aplast. Anämie)	0,57	1,8	314	—	—	1,22
M. ♀	(Hypertonie)	1,02	—	298	—	—	1,18
B. ♂	(Grippe)	0,64	0,8	300	0,70	—	1,03
I. ♀	(Colontumor)	—	—	348	0,61	—	1,02
B. ♂	(Myocardschäden)	1,48	—	249	—	—	0,99
F. ♂	(Lues III)	—	—	280	0,62	148	0,96
G. ♀	(Obesitas,V'dauungsbeschw.)	0,86	—	182	—	—	0,95
B. ♀	(Starke Obesitas)	0,61	—	236	—	—	0,93
W. ♀	(Ulcus ventr., Anämie)	—	--	316	0,54	—	0,93
H. ♂	(Polyarthritis)	—	—	280	0,60	—	0,92
K. ♀	(Hepatopathie)	0,81	1,0	221	0,66	—	0,91
E. ♂	(Myocardschäden)	0,47	—	212	0,64	—	0,91
F. ♀	(Stat. n. essent. Thrombopenie, Milzextirpation)	0,51	—	195	0,60	163	0,90
W. ♀	(Icterus, Myodegen. cord.)	24,7	—	209	0,62	—	0,90
M. ♀	(Graviditas m. V.)	—	—	224	0,58	203	0,90
D. ♂	(Lues III)	—	—	244	0,58	—	0,87
W. ♂	(Darmkatarrh)	—	—	287	0,55	135	0,87
D. ♀	(Wirbelsäulenaffektion)	1,12	—	212	—	—	0,84
B. ♂	(Myocardschäden)	—	—	180	0,62	—	0,84
K. ♂	(Ulcus ventriculi)	—	—	218	0,59	—	0,83
S. ♂	(Adipositas)	—	—	178	0,63	—	0,83
R. ♂	(Hypertension, dilat. cord.)	—	—	225	0,55	147	0,82
X. ♂	(Hyperphysäre Magerkeit)	—	—	223	0,55	—	0,82
P. ♀	(Vitium cordis)	0,79	1,4	218	—	—	0,81
S. ♀	(Neurasthenie)	2,77	—	236	—	—	0,81
F. ♂	(Atrioventrikul. Block)	—	—	221	—	—	0,81
V. ♂	(Epistaxis, Hypertension)	—	—	232	0,52	164	0,80
S. ♂	(Cholelithiasis)	2,22	—	223	—	—	0,80
B. ♂	(Hyperglobulie)	2,30	—	206	—	—	0,79
V. ♂	(Hypertonie)	0,99	—	230	0,52	150	0,79
W. ♂	(Polyarthritis rh. chron.)	—	—	190	0,56	—	0,79
L. ♀	(Rheuma)	0,89	—	148	—	—	0,77
C. ♂	(Ulcus ventriculi)	0,64	1,1	216	—	—	0,77
S. ♂	(Lues III)	—	—	206	0,52	—	0,76
S. ♀	(Myeloische Leukämie)	0,43	—	144	—	—	0,75
P. ♂	(Icterus)	7,15	2,2	217	0,46	—	0,74
B. ♀	(Subicterus)	1,56	1,3	196	0,43	—	0,71
W. ♀	(Achylie, Colonstenose)	1,74	—	170	0,46	113	0,70
B. ♂	(Vitium cordis)	1,20	—	212	—	—	0,70
M. ♂	(Mononucleosis infect. abdom. Form)	—	—	185	0,45	132	0,67
N. ♂	(Parkinsonismus)	—	—	196	—	—	0,64

Serum	Bilirub.	Gallens.	Cholesterol	Jodzahl	Lezithin	S P.V.R.
K. ♀ (Anämie)	—	—	172	0,56	164	0,62
W. ♂ (Icterus)	14,70	9,1	107	—	—	0,60
P. ♂ (Myeloische Leukämie)	—	—	177	0,34	146	0,59
H. ♂ (Icterus catarrhal.)	8,70	6,9	150	—	—	0,58
A. ♂ (Anaemia perniciosa)	0,89	—	138	0,40	140	0,58
W. ♂ (Icterus)	12,40	—	107	—	—	0,56
B ♀ (Septische Purpura)	0,46	—	103	0,40	—	0,56
W. ♀ (Lebercirrhose, Aethylismus)	7,12	1,2	138	0,39	128	0,56
Kaninchen Nr. 1	—	—	85	0,30	—	0,38
„ Nr. 2	0,09	—	66	—	—	0,34
„ Nr. 3	0,05	—	66	0,26	—	0,32
„ Nr. 4	0,17	—	47	0,33	—	0,31
„ Nr. 5	—	—	52	0,24	—	0,29

Diese Serie von Versuchen zeigt, daß der höchste S.P.V.R.-Wert bei einem stark icterischen Serum erhalten wurde. Gleichwohl erzeugt aber nicht jeder Icterus eine außergewöhnlich hohe S.P.V.R. So ergab ein Icterus mit einem Bilirubingehalt von 7,15 mgr % und ein anderer mit einem Bilirubingehalt von 14,7 mgr % (beides zu hohe Werte) eine völlig normale Reaktion: 0,74 und 0,60. Einen zu niederen Wert der S.P.V.R. haben zwei Icterusfälle ergeben, der eine mit 12,4 mgr % und der andere mit 7,12 mgr % Bilirubingehalt, nämlich: 0,56 und 0,56. In all diesen Fällen von Icterus, die eine normale oder eine verminderte S.P.V.R. aufweisen, fanden wir einen zu niederen Cholesterolgehalt. Aus den angestellten Versuchen ist ersichtlich, daß bei vermindertem Cholesterolgehalt die S.P.V.R. niedere Werte gibt, und umgekehrt hohe bei erhöhtem Cholesterolgehalt, ohne daß jedoch zwischen diesen beiden Werten ein Parallelismus zu finden wäre. Wie wir aus den über 50 zusammengestellten Fällen ersehen, ist die S.P.V.R. in keiner Weise eine spezifische Reaktion.

Zusammenfassung

Wir haben in dieser Arbeit den Mechanismus der S.P.V.R. nach der Modifizierung von Chabrol, Charonnat und Blanchard studiert und haben die Rolle der verschiedenen Lipoid-Faktoren, welche diese Reaktion im Serum bedingen, kennen gelernt. Unsere Untersuchungen gestatten uns, die Schlußfolgerung zu ziehen, daß drei Faktoren bei dieser Reaktion mitspielen:

1. die ungesättigten Fettsäuren,
2. das Cholesterol, und
3. das Lezithin.

Die Summe der drei genannten Faktoren ist gleich dem Wert der

S.P.V.R. innerhalb der Fehlergrenze, den man experimentell erhält bei der Serumaktion. Dadurch, daß drei Substanzen die Reaktion erzeugen, kann diese nicht als spezifische Reaktion angesehen werden, und daher ist auch ihre Anwendung zur Klärung einer Diagnose oder zu deren Erleichterung sehr beschränkt. Jedwelche Störung im Organismus, die irgendwie eine Wirkung auf den Lipoide-Gehalt ausübt, hat sogleich auch eine Beeinflußung der S.P.V.R. zur Folge.

Wenn man auch die S.P.V.R. nicht zur Sicherstellung einer Diagnose verwerten kann, so hat sie doch den Vorteil, daß sie, weil sie einfach ist und nicht viel Zeit erfordert, zahlreiche, überflüssige Analysen anzustellen vermeiden läßt und immerhin ein gewisser Wegweiser sein kann, falls man detailliertere und präzisere Untersuchungen der Lipoide im Serum anstellen will.

Im Grunde aber ist das der einzige Vorteil, den man der S.P.V.R. vom klinischen Standpunkt aus beimessen kann.

Bibliographie

1) Inouye, Ztschr. f. physiol. Chem. 1908. — 57. — 283.
2) Chabrol, Charonnat, Cosset, Blond, Soc. chim. biol. 1934. T. CXV. p. 834.
3) E. Chabrol et R. Charonnat, Presse medicale, No. 96. 1er déc. 1937.
4) E. Chabrol, R. Charonnat et J. Blanchard, Presse medicale No. 15. 13 févr. 1940.
5) Bull. soc. chim. biol. T. XXI. avril 1939. No. 4. p. 537.
6) Jendrassik und Grot, Biochem. Ztschr., Bd. 294, Heft 1—2. 1928. p. 81.
7) Thomas P., Manuel de Biochimie, p. 373. — Masson. Paris 1935.
8) Gigon et Noverraz, No. spécial du Journal Suisse de Médecine, dédié auf Prof. Louis Michaud, Lausanne, 70e. année, 1940. No. 23. p. 145.
9) Labbé et Deveux, Techniques de laboratoires, p. 824. — Masson. Paris 1932.
10) G. H. Roget et L. Binet, Traité de physiologie normale et pathologique. T. III. Physiologie du foie et de l'appareil urinaire, p. 67. Masson. Paris 1939.